

559602

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年 7 月 28 日 (28.07.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/067918 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 31/352, 31/192, 31/216, 31/11, 47/10, 47/14, 47/24, 47/36, 35/64, 7/00, A61P 39/06, A23L 1/30
- (74) 代理人: 中村 静男 (NAKAMURA, Shizuo); 〒110-0016 東京都台東区台東 2 丁目 2 4 番 1 0 号 エステビル 3 階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/019773
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2004 年 12 月 24 日 (24.12.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願 2004-8862 2004 年 1 月 16 日 (16.01.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本プロポリス株式会社 (NIHON PROPOLIS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒325-0025 栃木県那須塩原市下厚崎字東原 5 番地 4 5 2 Tochigi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 緑川 淑 (MIDORIKAWA, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒325-0025 栃木県那須塩原市下厚崎字東原 5 番地 4 5 2 日本プロポリス株式会社内 Tochigi (JP). 門田 重利 (KADOTA, Shigetoshi) [JP/JP]; 〒930-0882 富山県富山市五艘 1 3 5 7-1 7 Toyama (JP). 松繁 克道 (MATSUSHIGE, Katsumichi) [JP/JP]; 〒273-0003 千葉県船橋市宮本 8-2 2-1 9 Chiba (JP).
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

WO 2005/067918 A1

(54) Title: ACTIVE OXYGEN ELIMINATOR ORIGINATING IN NATURAL MATERIAL AND USE OF THE SAME

(54) 発明の名称: 天然物由来の活性酸素消去剤およびその用途

(57) Abstract: An active oxygen eliminator originating in a natural material which comprises water, an organic solvent, an emulsifier and, as the main active ingredients, p-coumalic acid, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid, 3,5-di-O-caffeoylquinic acid, 4-hydroxy-3-prenylcinnamic acid and 3,5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavonol; and a food and a cosmetic containing this active oxygen eliminator.

(57) 要約: 水と、有機溶剤と、乳化剤を含むと共に、p-クマリン酸、3,4-ジ-O-カフェオイルキナ酸、3,5-ジ-O-カフェオイルキナ酸、4-ヒドロキシ-3-プレニルケイ皮酸および3,5,7-トリヒドロキシ-4'-メトキシフラボノールを主要有効成分として含む天然物由来の活性酸素消去剤、並びに該活性酸素消去剤を含む食品および化粧料である。

明細書

天然物由来の活性酸素消去剤およびその用途

技術分野

本発明は、天然物由来の活性酸素消去剤およびその用途に関する。さらに詳しくは、本発明は、有効成分としてフラボノイド類やヒドロキシケイ皮酸誘導体などを含み、食品用や化粧料用などとして有用な天然物由来の活性酸素消去剤、並びに該活性酸素消去剤を含む食品および化粧料に関するものである。

背景技術

酸素は生体にとって代謝によるエネルギーの産生など、生命の維持には必須な物質であるが、生体内外での諸反応系、すなわち一部の免疫反応や紫外線・放射線照射等により反応性に富んだ活性酸素種（スーパーオキシドアニオン： O_2^- 、過酸化水素： H_2O_2 、ヒドロキシルラジカル： $\text{OH}\cdot$ 、一重項酸素： $^1\text{O}_2$ 等）やフリーラジカルを産生する。これらの活性酸素種やフリーラジカルは、例えばある免疫反応においては侵入した細菌等の異物を不活性化することには役に立つ一方で、生体成分と反応して脂質の過酸化、蛋白質や核酸の変性を引き起こし、種々の疾病や老化の促進の原因となることが知られている。特に皮膚は、身体の最外層にあるために、紫外線や放射線等の外部要因により発生する活性酸素種やフリーラジカルの影響を受け易く、これらが皮膚で過剰に産生すると、ラジカル反応による過酸化脂質の生成やシミ、ソバカス等の皮膚の異常な色素の産生が増強されることが知られている。

生体内で種々の原因により生じたスーパーオキシドアニオン O_2^- は、酵素スーパーオキシドディスムターゼ（以下SODと略記する）により H_2O_2 に変換され、さらに H_2O_2 は酵素カタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼの作用によって水と酸素とに分解される。これらの酵素に加えて生体内にはビタミンCやビタミンE等の食品由来の抗酸化物質が存在し、これらが生体内のラジカル反応や酸化反応を抑制するネットワークを形成して活性酸素やフリーラジカル

による諸障害の防御にあたると考えられている。しかし、周囲ならびに生体内の環境の変化、例えば細菌やウイルス等による感染、食物の摂取状態や栄養状態の変化、紫外線の過剰な照射、周囲から受ける種々のストレスおよび加齢・老化等により上記のネットワークのバランスが崩れると、生体内で産生される活性酸素やフリーラジカルの代謝バランスが崩れ、結果として過酸化脂質量の増加、皮膚炎、シミ、シワ、湿疹、ソバカス等の美容上の障害となる諸症状が現れ、さらには関節リウマチ、動脈硬化、糖尿病、肝炎、腎炎や癌等の疾病が引き起こされることが知られている。

また、人が摂取する食品や食品添加物についても、紫外線や放射線の作用により発生する活性酸素やフリーラジカルによる酸化や通常の酸化によって、それらに含まれている脂質その他の成分の過酸化や変性が起こり、それら酸化、変性物の摂取は健康上好ましくないことは周知のことである。さらに、化粧品、皮膚外用剤に配合されることがある不飽和脂質を含む天然油脂や界面活性剤の中には、紫外線等の作用によって酸化を受け易いものがあることが知られており、結果として変色や異臭の発生等の好ましくない現象が起こることが多い。このような酸化を受け易い化粧品基剤の使用によって、前述の諸原因によって皮膚に生ずる脂質過酸化物の量が増大し、上記の美容上の障害となる諸症状が増幅されることは容易に推測されることである。

従来、化粧品、食品、食品添加物および飼料に添加されている抗酸化剤としては、ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）、ブチルヒドロキシアニソール（BHA）、エトキシキン等の合成抗酸化剤の他、アスコルビン酸やビタミンE等の天然抗酸化剤がある。上記の合成抗酸化剤は、抗酸化効果は優れているが、発癌性等の安全性に問題があるものがあり、その使用については制限されているものもある。一方、上記の天然由来の抗酸化剤は、安全性については評価されるものの、抗酸化効果は合成抗酸化剤よりもかなり劣るという欠点がある。

近年、このような状況下で活性酸素・フリーラジカル消去効果や抗酸化効果を有する物質もしくは組成物の化粧品科学的、食品科学的また薬学的見地からの探索が活発に行われ、その結果、かなりの数の活性酸素・フリーラジカル消去剤や抗酸化剤が知られるようになった。例えば、オウゴンに含まれるフラボノイド成

分であるバイカレインを含有する活性酸素消去剤（例えば、特公平4-34969号公報参照）、クローブ油またはその成分であるデハイドロジオイゲノールからなる活性酸素消去・除去剤（例えば、特開平3-227938号公報参照）、クルミ殻抽出物を有効成分とする活性酸素消去剤（例えば、特開平7-69912号公報参照）などが提案されている。

一方、従来より、天然の抗菌性物質や健康増進物質としてプロポリスが知られている。このプロポリスは、ミツバチが巣の保全のために作る濃緑色～茶褐色の粘着性物質であり、ミツバチが樹木より採取したガム質・樹液・植物色素系物質・香油等の集合体に、自身の分泌物・蜜蝋等を混合して作られる。該プロポリスについては、抗腫瘍活性、抗酸化活性、抗炎症活性、抗菌活性など様々な生物活性が報告されている。生理活性を有する化合物群としてはケイ皮酸誘導体、フラボノイド類、エステル類や、その他のフェノール性化合物群等があげられ、亜熱帯産のプロポリスにおいては加えてテルペン類の存在が報告されている。

発明の開示

本発明は、活性酸素やフリーラジカル消去能が高く、かつ人体に対して安全であって、各種用途に有用な天然物由来の活性酸素消去剤およびその用途を提供することを目的とするものである。

本発明者らは、前記目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、例えばプロポリス原塊粉末の抽出処理で得ることのできる、フラボノイド類、ヒドロキシケイ皮酸誘導体、その他フェノール性化合物などの複数種の有効成分を含む天然物由来の物質により、その目的を達成し得ることを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) 水と、有機溶剤と、乳化剤を含むと共に、p-クマリン酸、3,4-ジ-*O*-カフェオイルキナ酸、3,5-ジ-*O*-カフェオイルキナ酸、4-ヒドロキシ-3-プレニルケイ皮酸および3,5,7-トリヒドロキシ-4'-メトキシフラボノールを主要有効成分として含むことを特徴とする天然物由来の活性酸素消去剤、

(2) さらに、3,5-ジプレニル-4-ヒドロキシケイ皮酸、カエムフェライ

ド、ベツレトール、クロロゲン酸、エルマニン、クリシン、カフェー酸、カエムフェロールおよびバニリンを有効成分として含む上記（１）項に記載の天然物由来の活性酸素消去剤、

（３）有機溶剤が、分子中に水酸基２個以上を有する多価アルコール系化合物である上記（１）または（２）項に記載の天然物由来の活性酸素消去剤、

（４）乳化剤が、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、レシチン類およびサポニン類の中から選ばれる少なくとも１種である上記（１）、（２）または（３）項に記載の天然物由来の活性酸素消去剤、

（５）上記（１）～（４）項のいずれか１項に記載の活性酸素消去剤を含むことを特徴とする食品、および

（６）上記（１）～（４）項のいずれか１項に記載の活性酸素消去剤を含むことを特徴とする化粧品、
を提供するものである。

本発明によれば、活性酸素やフリーラジカル消去能が高く、かつ人体に対して安全であって、各種用途に有用な天然物由来の活性酸素消去剤、並びに該活性酸素消去剤を含む食品および化粧料を提供することができる。

図面の簡単な説明

図１は、抽出溶媒として水を用いて得られたプロポリス原塊抽出物の１例の高速液体クロマトグラムである。

図２は、抽出溶媒としてグリセリンを用いて得られたプロポリス原塊抽出物の１例の高速液体クロマトグラムである。

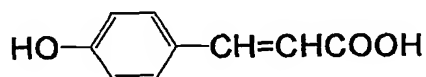
図３は、抽出溶媒として水とグリセリンの混合液を用いて得られたプロポリス原塊抽出物の１例の高速液体クロマトグラムである。

図４は、抽出溶媒として水とグリセリンと乳化剤の混合液を用いて得られたプロポリス原塊抽出物の１例の高速液体クロマトグラムである。

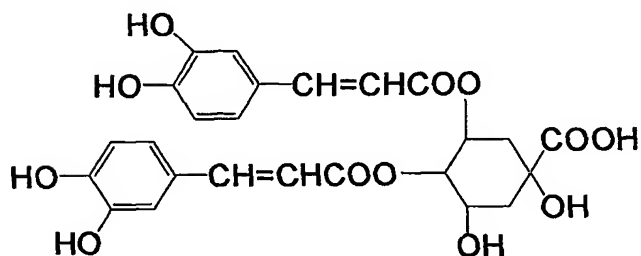
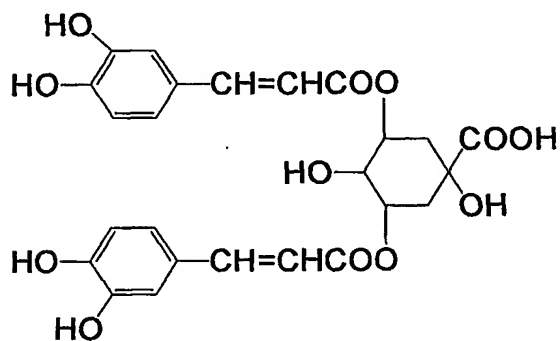
発明を実施するための最良の形態

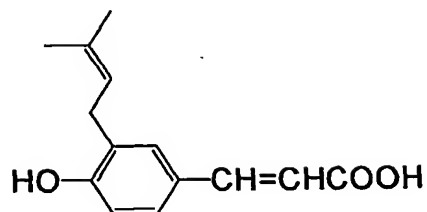
本発明の活性酸素消去剤は、水と、有機溶剤と、乳化剤を含むと共に、下記の構造を有する、*p*-クマリン酸（*p*-coumaric acid）、3, 4-

ジ-*O*-カフェオイルキナ酸 (3, 4-di-*O*-caffeoylquinic acid)、3, 5-ジ-*O*-カフェオイルキナ酸 (3, 5-di-*O*-caffeoylquinic acid)、4-ヒドロキシ-3-プレニルケイ皮酸 (4-hydroxy-3-prenylcinnamic acid) および 3, 5, 7-トリヒドロキシ-4'-メトキシフラボノール (3, 5, 7-trihydroxy-4'-methoxyflavonol) を主要有効成分として含む天然物由来のものである。

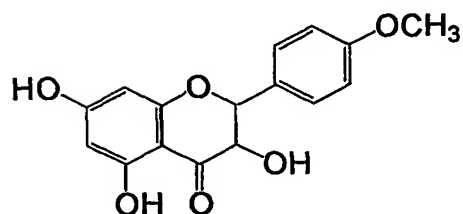


p-クマリン酸

3, 4-ジ-*O*-
カフェオイルキナ酸3, 5-ジ-*O*-
カフェオイルキナ酸

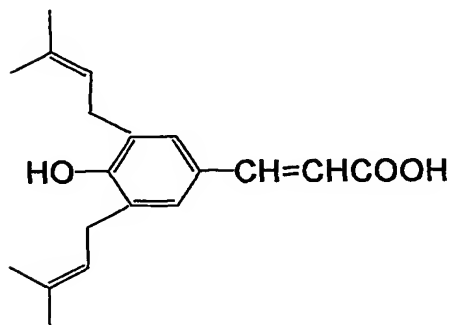


4-ヒドロキシ-3-
プレニルケイ皮酸

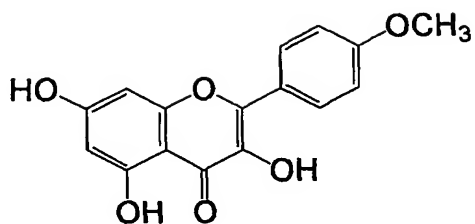


3, 5, 7-トリヒドロ
キシ-4'-メトキシフラ
ボノール

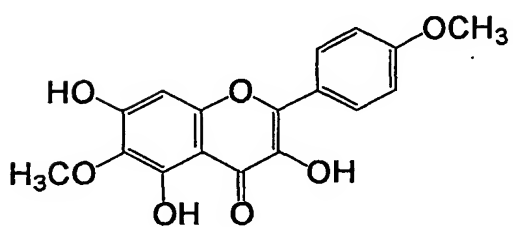
本発明の活性酸素消去剤は、さらに有効成分として、下記の構造を有する、3, 5-ジプレニル-4-ヒドロキシケイ皮酸（アーテピリンC）[3, 5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillinC)]、カエムフェライド (kaempferide)、ベツレトール (betuletol)、クロロゲン酸 (chlorogenic acid)、エルマニン (ermanin)、クリシン (chrysin)、カフェー酸 (caffeic acid)、カエムフェロール (kaempferol) およびバニリン (vanillin) を含むことができる。



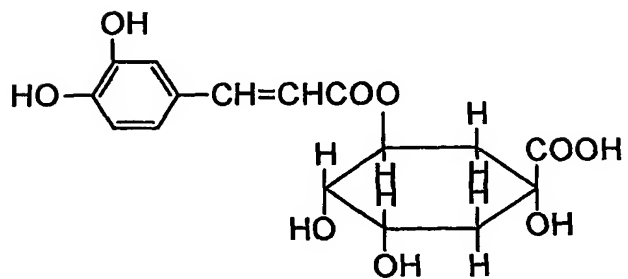
3, 5-ジプレニル-4-ヒドロキシ
ケイ皮酸



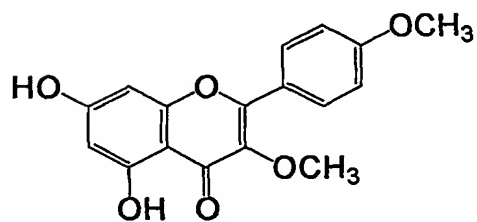
カエムフェライド



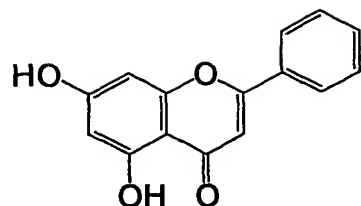
ベツレトール



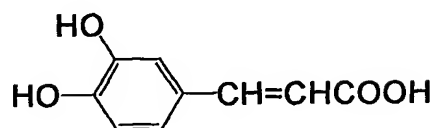
クロロゲン酸



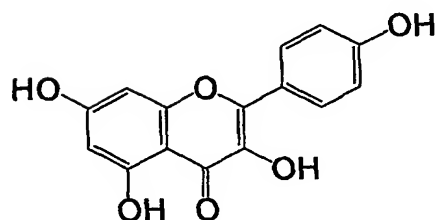
エルマニン



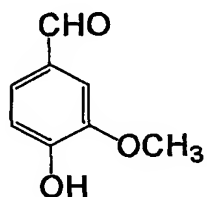
クリシン



カフェー酸



カエムフェロール



バニリン

なお、カエムフェライドは、4'-メトキシ-3, 5, 7-トリヒドロキシフラボン、ベツレトールは、4', 6-ジメトキシ-3, 5, 7-トリヒドロキシフラボン、エルマニン、3, 4'-ジメトキシ-5, 7-ジヒドロキシフラボン、クリシンは、5, 7-ジヒドロキシフラボン、カエムフェロールは、3, 4', 5, 7-テトラヒドロキシフラボンのことである。

本発明の活性酸素消去剤に含まれる有機溶剤としては、分子中に水酸基2個以

上を有する多価アルコール系化合物が好ましく、具体的には、グリセリン、エチレングリコール、ジエチレングリコール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、グリセリンのアルキレンオキサイド付加物、エチレングリコールのアルキレンオキサイド付加物、プロピレングリコールのアルキレンオキサイド付加物、グルコノデルタラクトン、さらにはキシリトール、ヘキシトール、マンニトール、ソルビトールなどの糖アルコール等を挙げることができる。これらは1種含まれていてもよく、2種以上含まれていてもよいが、該活性酸素消去剤を食品用途に用いる場合には、特にグリセリンおよび各種の糖アルコールが好適である。

一方、乳化剤としては、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、シヨ糖脂肪酸エステル、レシチン類およびサポニン類などを例示することができる。

前記グリセリン脂肪酸エステルとしては、例えばグリセリン＝モノラウレート、グリセリン＝モノパルミテート、グリセリン＝モノステアレート、グリセリン＝モノオレエート、グリセリン＝モノリノレート、グリセリン＝モノリシノレートなどを挙げることができる。

ポリグリセリン脂肪酸エステルとしては、例えばジグリセリン＝モノラウレート、ジグリセリン＝モノパルミテート、ジグリセリン＝モノステアレート、ジグリセリン＝モノオレエート、ジグリセリン＝モノリノレート、ジグリセリン＝モノリシノレート、テトラグリセリン＝モノラウレート、テトラグリセリン＝ジラウレート、テトラグリセリン＝モノパルミテート、テトラグリセリン＝ジパルミテート、テトラグリセリン＝モノステアレート、テトラグリセリン＝ジステアレート、テトラグリセリン＝モノオレエート、テトラグリセリン＝ジオレエート、テトラグリセリン＝モノリノレート、テトラグリセリン＝ジリノレート、テトラグリセリン＝モノリシノレート、テトラグリセリン＝ジリシノレート、テトラグリセリン＝モノベヘネート、テトラグリセリン＝ジベヘネート、ペンタグリセリン＝モノラウレート、ペンタグリセリン＝ジラウレート、ペンタグリセリン＝モノパルミテート、ペンタグリセリン＝ジパルミテート、ペンタグリセリン＝モノ

ステアレート、ペンタグリセリン＝ジステアレート、ペンタグリセリン＝モノオレエート、ペンタグリセリン＝ジオレエート、ペンタグリセリン＝モノリノレート、ペンタグリセリン＝ジリノレート、ペンタグリセリン＝モノリシノレート、ペンタグリセリン＝ジリシノレート、ペンタグリセリン＝モノベヘネート、ペンタグリセリン＝ジベヘネート、デカグリセリン＝モノラウレート、デカグリセリン＝ジラウレート、デカグリセリン＝トリラウレート、デカグリセリン＝モノパルミテート、デカグリセリン＝ジパルミテート、デカグリセリン＝トリパルミテート、デカグリセリン＝モノステアレート、デカグリセリン＝ジステアレート、デカグリセリン＝トリステアレート、デカグリセリン＝モノオレエート、デカグリセリン＝ジオレエート、デカグリセリン＝トリオレエート、デカグリセリン＝モノリノレート、デカグリセリン＝ジリノレート、デカグリセリン＝トリリノレート、デカグリセリン＝モノリシノレート、デカグリセリン＝ジリシノレート、デカグリセリン＝トリリシノレート、デカグリセリン＝モノベヘネート、デカグリセリン＝ジベヘネート、デカグリセリン＝トリベヘネート、デカグリセリン＝モノイソステアレート、デカグリセリン＝セスキイソステアレート、デカグリセリン＝ジイソステアレート、デカグリセリン＝トリイソステアレート、デカグリセリン＝モノ（12-ヒドロキシ）ステアレート、デカグリセリン＝ジ（12-ヒドロキシ）ステアレート、デカグリセリン＝トリ（12-ヒドロキシ）ステアレート等を挙げることができる。

プロピレングリコール脂肪酸エステルとしては、例えばプロピレングリコール＝モノラウレート、プロピレングリコール＝モノパルミテート、プロピレングリコール＝モノステアレート、プロピレングリコール＝モノオレエート、プロピレングリコール＝モノリノレート、プロピレングリコール＝モノリシノレート、プロピレングリコール＝モノイソステアレート、プロピレングリコール＝モノ（12-ヒドロキシ）ステアレートなどを挙げることができる。

ソルビタン脂肪酸エステルとしては、例えばソルビタン＝モノラウレート、ソルビタン＝ジラウレート、ソルビタン＝モノパルミテート、ソルビタン＝ジパルミテート、ソルビタン＝モノステアレート、ソルビタン＝ジステアレート、ソルビタン＝モノオレエート、ソルビタン＝ジオレエート、ソルビタン＝モノリノレ

ート、ソルビタン＝ジリノレート、ソルビタン＝モノリシノレート、ソルビタン＝ジリシノレート、ソルビタン＝モノベヘネート、ソルビタン＝ジベヘネート、ソルビタン＝モノイソステアレート、ソルビタン＝ジイソステアレート、ソルビタン＝モノ（１２－ヒドロキシ）ステアレート、ソルビタン＝ジ（１２－ヒドロキシ）ステアレート等が挙げられる。

シヨ糖脂肪酸エステルとしては、例えばシヨ糖＝モノラウレート、シヨ糖＝ジラウレート、シヨ糖＝モノパルミテート、シヨ糖＝ジパルミテート、シヨ糖＝モノステアレート、シヨ糖＝ジステアレート、シヨ糖＝モノオレエート、シヨ糖＝ジオレエート、シヨ糖＝モノリノレート、シヨ糖＝ジリノレート、シヨ糖＝モノリシノレート、シヨ糖＝ジリシノレート、シヨ糖＝モノイソステアレート、シヨ糖＝ジイソステアレート、シヨ糖＝モノ（１２－ヒドロキシ）ステアレート、シヨ糖＝ジ（１２－ヒドロキシ）ステアレート等を挙げることができる。

また、レシチン類としては、例えば大豆レシチンや他の植物レシチンなどを、サポニン類としては、例えばキラヤ抽出物やダイズサポニンなどを挙げることができる。

これらの乳化剤は、１種含まれていてもよく、２種以上含まれていてもよい。なお、前記乳化剤は、食品用として使用可能であるので、当該活性酸素消去剤を食品用途に用いる場合、含まれていてもかまわない。

本発明の活性酸素消去剤においては、水と前記有機溶剤と前記乳化剤の含有割合は、それらの合計量を１００質量%とすると、通常水：５～５０質量%、有機溶剤：４５～９４．９質量%および乳化剤：０．１～１０質量%であり、好ましくは、水：５～３０質量%、有機溶剤：６５～９４．５質量%および乳化剤：０．１～５質量%の範囲である。

本発明の活性酸素消去剤においては、前記有効成分の合計含有量は、当該活性酸素消去剤の用途に応じて適宜選定されるが、通常３～４０質量%程度である。

本発明の活性酸素消去剤は、例えば以下に示すように、プロポリス原塊を抽出処理することにより製造することができる。

原料のプロポリス原塊は、粉碎および抽出処理を効率的に行うために、１５℃以下、好ましくは０～１０℃程度の温度に保存したものをを用いることが望ましい

。まず、上記プロポリス原塊を粉碎機により粉碎処理する。この際、粉碎機に装着するスクリーンの孔径は、通常1～5mm径、好ましくは2～3mm径である。次いで、このプロポリス原塊粉碎物1質量部に対し、水と前記有機溶剤と前記乳化剤を前記の割合で含有する混合液からなる抽出溶媒を3～7質量部程度加える。抽出溶媒の使用量が3質量部未満ではプロポリス原塊粉碎物と抽出溶媒の粘性により、抽出作業効率が低下する原因となり、また7質量部を超えると有効成分の含有量が低下するおそれがある。

次に、50～90℃程度、好ましくは65～80℃の温度に加熱して30～120分間程度抽出処理を行う。抽出処理後、ろ過処理して固形分を取り除くことにより、本発明の活性酸素消去剤が得られる。

このようにして得られた本発明の活性酸素消去剤は、用途に適した濃度になるように、抽出溶媒を留去または添加して、濃度調整を行うことができる。さらに、必要により、凍結乾燥や噴霧乾燥を行い、粉末状で用いてもよい。

本発明の活性酸素消去剤は、フラボノイド類、ヒドロキシケイ皮酸誘導体、その他フェノール性化合物など、親水性から疎水性まで幅広い成分を含んでおり、高い活性酸素・フリーラジカル消去能および抗酸化能を有し、例えば食品用途、化粧品用途、さらには飼料用途などに用いることができる。

本発明の活性酸素消去剤は、そのまま液状品として食品や化粧品などの組成物に配合するか、または予め該有効成分を製剤化したものを前記組成物に配合して、活性酸素消去効果および抗酸化効果を賦与して前記組成物の商品価値を高めることが可能である。

製剤化の例としては、錠剤、カプセル剤、散剤、または顆粒剤の場合は、上記有効成分を澱粉、乳糖やマニトール等の賦型剤、カルボキシメチルセルロースやヒドロキシプロピルセルロース等の結合剤、結晶セルロースやカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤、タルクやステアリン酸マグネシウム等の潤沢剤、その他必要に応じて湿潤剤、着色剤や香料等を適宜組み合わせて処方することにより製剤化することができる。また、液剤としては、水性もしくは油性の乳濁剤やシロップ剤にすればよく、単シロップ、ソルビトール、メチルセルロース

やカルボキシメチルセルロースナトリウム等の懸濁化剤、卵黄レシチン、ソルビタンモノ脂肪酸エステル、ラウロマクロゴールやヒマシ油等の乳化剤、その他必要に応じて防腐剤、保存剤や安定化剤等を適宜配合して製剤化することができる。軟膏の場合は、ワセリン、パラフィン、シリコン、プラスチックベース、植物油やロウ類等の疎水性基剤、精製ラノリン、カルボキシビニルポリマー、プロピレングリコールや1, 3-ブタンジオール等の親水性基剤、ポリエタノールアミン等の乳化剤等を適宜配合して製剤化することができる。

本発明はまた、前記活性酸素消去剤を含む食品および化粧料を提供する。

前記食品の形態としては、当該活性酸素消去剤そのもの、あるいは味噌、醤油、マヨネーズ等の調味料、サラダオイル等の食用油、各種調理食品、デザート類、氷菓、飴、チューインガムや果汁等の菓子・飲料等を挙げることができる。これらの食品には、使用目的に応じた任意の成分を用いることができる。例えば氷菓や飲料の場合は、果汁、甘味料、酸味料、着色料や香料等を適宜配合することができる。本発明の有効成分の食品への添加量は、その形態により適宜変えればよい。

一方、化粧品の形態としては種々のものを挙げることができ、例えばローション、乳液、クリームをはじめとして洗顔料、パック料、メーキャップ化粧料、頭髮化粧料、口唇化粧料、爪用化粧料、浴剤や制汗剤等が挙げられる。これらの化粧品には、使用目的に応じた任意の成分を用いることができ、例えばクリームの場合は、ワセリン、パラフィン、スクワランなどの疎水性基剤、ラノリン、プロピレングリコール、1, 3-ブタンジオール等の親水性基剤、脂肪酸モノグリセライド類、ソルビタン脂肪酸エステル類等の乳化剤、防腐剤、顔料、香料、その他必要に応じて栄養剤、保湿剤、美白剤及び紫外線吸収剤等を常法に従って適宜配合することができる。同様に、その他の製品についても、その種類に応じた必要成分を適宜配合することができる。本発明の有効成分の化粧品への添加量は、その形態により適宜変えればよい。

また、本発明の活性酸素消去剤は、飼料に配合することもできる。飼料の形態としては、種々のものを挙げることができ、例えば家畜・家禽・魚類用の粉状、練り製品状またはペレット状の配合飼料を挙げることができる。これらの飼料に

は、使用目的に応じた任意の成分を用いることができ、例えば練り製品状の飼料の場合は、着色料や香料等を適宜配合することができる。本発明の有効成分の飼料への添加量は、その形態により適宜変えればよい。

実施例

次に、本発明を実施例により、さらに詳細に説明するが、本発明は、これらの例によってなんら限定されるものではない。

実施例 1

(1) プロポリス原塊抽出物

抽出溶媒として、(a) 水単独、(b) グリセリン単独、(c) 水10質量%とグリセリン90質量%の混合液および(d) 水10質量%とグリセリン89質量%と乳化剤(グリセリン＝モノオレート)1質量%の混合液の4種を用いた。

プロポリス原塊(ブラジル産 *Baccharis dracunculifolia* 基源タイプ)の粉碎物25gに、上記の抽出溶媒(a)～(d)それぞれ200gを加え、攪拌しながら70℃で1時間抽出したのち、ろ過することにより、4種のプロポリス原塊抽出物(a)、(b)、(c)、(d)を得た。

(2) プロポリス食品規格成分含有量

上記(1)で得た4種のプロポリス原塊抽出物(a)、(b)、(c)、(d)について、財団法人日本健康・栄養食品協会プロポリス食品規格成分含有量測定法(平成7年改定)を適用し、吸光光度法($\lambda = 415 \text{ nm}$)を用い *Quercetin* (東京化成) 当量を測定した。その結果を表1に示す。

また、財団法人日本健康・栄養食品協会プロポリス食品規格成分含有量測定法(平成13年改定)により、プロポリス食品規格成分含有量(質量%)を測定した。その結果を表1に示す。

(3) DPPHラジカル消去活性

上記(1)で得た4種のプロポリス原塊抽出物(a)、(b)、(c)、(d)について、抗酸化活性を評価するためにこれらの様々な濃度のエタノール溶液を作製し、同量の60マイクロモル/L濃度のDPPH(1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル)(和光純薬工業)エタノール溶液と混合し、30分後の吸光度($\lambda = 520 \text{ nm}$)を測定しそれぞれのプロポリス原塊抽出物のDPP

Hラジカル消去の IC_{50} 値を求めた。その結果を表 1 に示す。

表 1

抽出溶媒の種類	Quercetin 当量 (mg)	プロポリス規格 成分含有量 (質量%)	DPPHラジカル 消去活性 (% IC_{50})
(a)	180	5.3	0.057
(b)	321	9.7	0.021
(c)	298	9.4	0.020
(d)	353	11.0	0.020

表 1 から、水と有機溶剤と乳化剤との混合液からなる抽出溶媒 (d) を用いて得られたプロポリス原塊抽出物 (d) (本発明の活性酸素消去剤) は、プロポリス食品規格成分含有量 (Quercetin 当量、質量%) が、他の抽出溶媒 (a)、(b)、(c) を用いて得られたプロポリス原塊抽出物 (a)、(b)、(c) よりも、高い値を示すことが分かる。

また、プロポリス原塊抽出物 (d) は、プロポリス原塊抽出物 (b)、(c) とほぼ同程度の高い DPPH ラジカル消去活性を示すことが分かる。

(4) HPLC による含有成分の分析

上記 (1) で得られたプロポリス原塊抽出物 (a)、(b)、(c)、(d) について、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析を行った。

HPLC の測定条件は、カラム CLC-ODS (150×6.0 mm, i. d.)、カラム温度 40℃、移動相は HPLC 用の送液を用い、リニアグラジエント条件で開始時 0.5% 酢酸 (和光純薬工業) - メタノール (和光純薬工業) (70:30 v/v) から 30 分後 0.5% 酢酸 - メタノール (20:80 v/v) 30 分以降保持、分析時間 50 分、流量 1.0 ml/分、測定波長 $\lambda = 275$ nm である。

プロポリス原塊抽出物 (a)、(b)、(c)、(d) は、HPLC 用蒸留水 (和光純薬工業) 又は HPLC 用メタノールに溶解 (濃度: 10 mg/ml) 後、ザルトリウスミニザルト (0.45 μ m, Goettingen, Germa

n y) にてろ過後、ろ液 $10\mu\text{l}$ をHPLC分析に用いた。

プロポリス原塊抽出物 (a)、(b)、(c) および (d) のクロマトグラムを、それぞれ図 1、図 2、図 3 および図 4 に示すと共に、クロマトグラムの保持時間を指標に、対応するピークの面積およびピーク高さを表 2 に示す。

表 2

化合物	R.T.	抽出物 (a)		抽出物 (b)		抽出物 (c)		抽出物 (d)	
		ピーク 面積	ピーク 高	ピーク 面積	ピーク 高	ピーク 面積	ピーク 高	ピーク 面積	ピーク 高
a	5.1	125290	6068	102569	4791	118675	5196	116167	5088
b	5.4	64218	3516	46914	2708	48786	3089	49486	3048
c	6.8	67983	2923	49105	2668	62464	3141	62474	3148
d	8.5	36815	2422	28592	2137	46542	2485	45092	2452
e	9.5	613175	63510	736791	79462	857236	90101	858366	90377
f	10.2	452055	26322	485907	31914	599082	35311	591450	35039
g	12.1	30527	2569	42026	4122	55639	4936	58157	5020
h	12.5	470342	31374	551542	39007	637013	42228	634979	41826
i	13.5			37333	2824	47636	3484	51477	3869
j	14.0			24799	2254	44366	3166	33045	3091
k	14.8			48871	4511	66827	4881	54559	5328
l	15.4			22556	1933	92674	2938	92312	2965
m	16.8	60700	3357	131557	9200	163546	10024	165998	10080
n	17.4			50201	4998	63077	5497	69077	6073
o	19.2	43709	3403	185670	19187	172834	16222	212072	20240
p	21.6			49904	2512	49549	1957	51501	2031
q	26.0			183990	13576	149566	10422	215098	15207
r	27.1			55024	5542	51095	4697	62991	5840
s	27.7			54329	5180	45326	3843	65628	5931
t	28.2			115784	11797	89560	8834	139402	14079
u	29.1			123128	5785	104342	3467	166476	5674
v	29.9			94387	8707	54525	2650	115563	7012
w	30.8			115012	8519	74578	6122	154801	10109
x	31.5			43888	2120	27047	1620	47771	2711
y	33.2			42724	4575	31290	3187	51312	5149
z	34.5			132448	14993	104284	11750	183655	20617
AA	39.4			154791	11187	126105	9084	232224	16489
AB	41.5			44139	2726	34879	2154	61039	3745

ピーク面積30000以下のデータは未記載。R.T.=保持時間 (分)

化合物名は、a : クロロゲン酸 (chlorogenic acid)、c : カフェー酸 (caffeic acid)、d : バニリン (vanillin)、e : p-クマリン酸 (p-coumaric acid)、f : 3, 5-ジ-*O*-カフェオイルキナ酸 (3, 5-di-*O*-caffeoylquinic acid)、h : 3, 4-ジ-*O*-カフェオイルキナ酸 (3, 4-di-*O*-caffeoylquinic acid)、o : 3, 5, 7-トリヒドロキシ-4'-メトキシフラボノール (3, 5, 7-trihydroxy-4'-methoxyflavonol)、p : カエムフェロール (kaempferol)、q : 4-ヒドロキシ-3-プレニルケイ皮酸 (4-hydroxy-3-prenylcinnamic acid)、s : クリシン (chrysin)、u : カエムフェライド (kaempferide)、z : 3, 5-ジプレニル-4-ヒドロキシケイ皮酸 (アーテピリンC) [3, 5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillinC)] である。

図1～図4に示すように、プロポリス原塊抽出物 (a) と比較して、プロポリス原塊抽出物 (b)、(c)、(d) のクロマトグラムでは、明らかに移動相のメタノールの割合が上昇するにつれ、プロポリス原塊抽出物 (a) のクロマトグラムには見られなかったピークが出現することが分かり、これにより、さらに個別のピークを用いての比較で、プロポリス原塊抽出物 (b)、(c)、(d) のクロマトグラム上に疎水性を示すと考えられる化合物のピーク群の出現により、上記 (2) および (3) で示された結果が裏付けられた。さらに詳しくは親水性の化合物 a～h のピーク面積及びピーク高は、4 種のプロポリス原塊抽出物においてほぼ同レベルか、プロポリス原塊抽出物 (d) において優位な傾向が確認される。また、i～AB の化合物については、化合物 m, o (3, 5, 7-トリヒドロキシ-4'-メトキシフラボノール)、z (3, 5-ジプレニル-4-ヒドロキシケイ皮酸) を除き、プロポリス原塊抽出物 (b)、(c)、(d) のクロマトグラム上に明確に確認されるものであるが、プロポリス原塊抽出物 (d) において優位な傾向が確認される。

さらに詳しくは、保持時間 15 分以前に溶出する生理活性物質 a (クロロゲン

酸)、c(カフェー酸)、f(3,5-ジ-*O*-カフェイルキナ酸)、h(3,4-ジ-*O*-カフェオイルキナ酸)などの測定値を変えずに、保持時間25分以降に溶出する有力な生理活性成分u(カエムフェライド)、z(3,5-ジプレニル-4-ヒドロキシケイ皮酸)について、プロポリス原塊抽出物(b)、(c)と(d)の比較において、プロポリス原塊抽出物(d)に明らかに測定値の増加が確認できる。したがって、上記(2)における測定値の増加は、化合物u、zの増加が寄与するものと考えられ、プロポリス原塊抽出物(d)(本発明の活性酸素消去剤)は、親水性から疎水性まで、幅広い成分を含有し、ラジカル消去能を始め、有望な生理活性を有することが示唆される。

産業上の利用の可能性

本発明の活性酸素消去剤は、人体に対する安全性が高く、かつ高い活性酸素・フリーラジカル消去能および抗酸化能を有し、例えば食品用、化粧品用、飼料用などとして好適に用いられる。

請求の範囲

1. 水と、有機溶剤と、乳化剤を含むと共に、p-クマリン酸、3,4-ジ-*O*-カフェオイルキナ酸、3,5-ジ-*O*-カフェオイルキナ酸、4-ヒドロキシ-3-プレニルケイ皮酸および3,5,7-トリヒドロキシ-4'-メトキシフラボノールを主要有効成分として含むことを特徴とする天然物由来の活性酸素消去剤。
2. さらに、3,5-ジプレニル-4-ヒドロキシケイ皮酸、カエムフェライド、ベツレトール、クロロゲン酸、エルマニン、クリシン、カフェー酸、カエムフェロールおよびバニリンを有効成分として含む請求項1に記載の天然物由来の活性酸素消去剤。
3. 有機溶剤が、分子中に水酸基2個以上を有する多価アルコール系化合物である請求項1または2に記載の天然物由来の活性酸素消去剤。
4. 乳化剤が、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、レシチン類およびサポニン類の中から選ばれる少なくとも1種である請求項1、2または3に記載の天然物由来の活性酸素消去剤。
5. 請求項1～4のいずれか1項に記載の活性酸素消去剤を含むことを特徴とする食品。
6. 請求項1～4のいずれか1項に記載の活性酸素消去剤を含むことを特徴とする化粧料。

図面

図 1

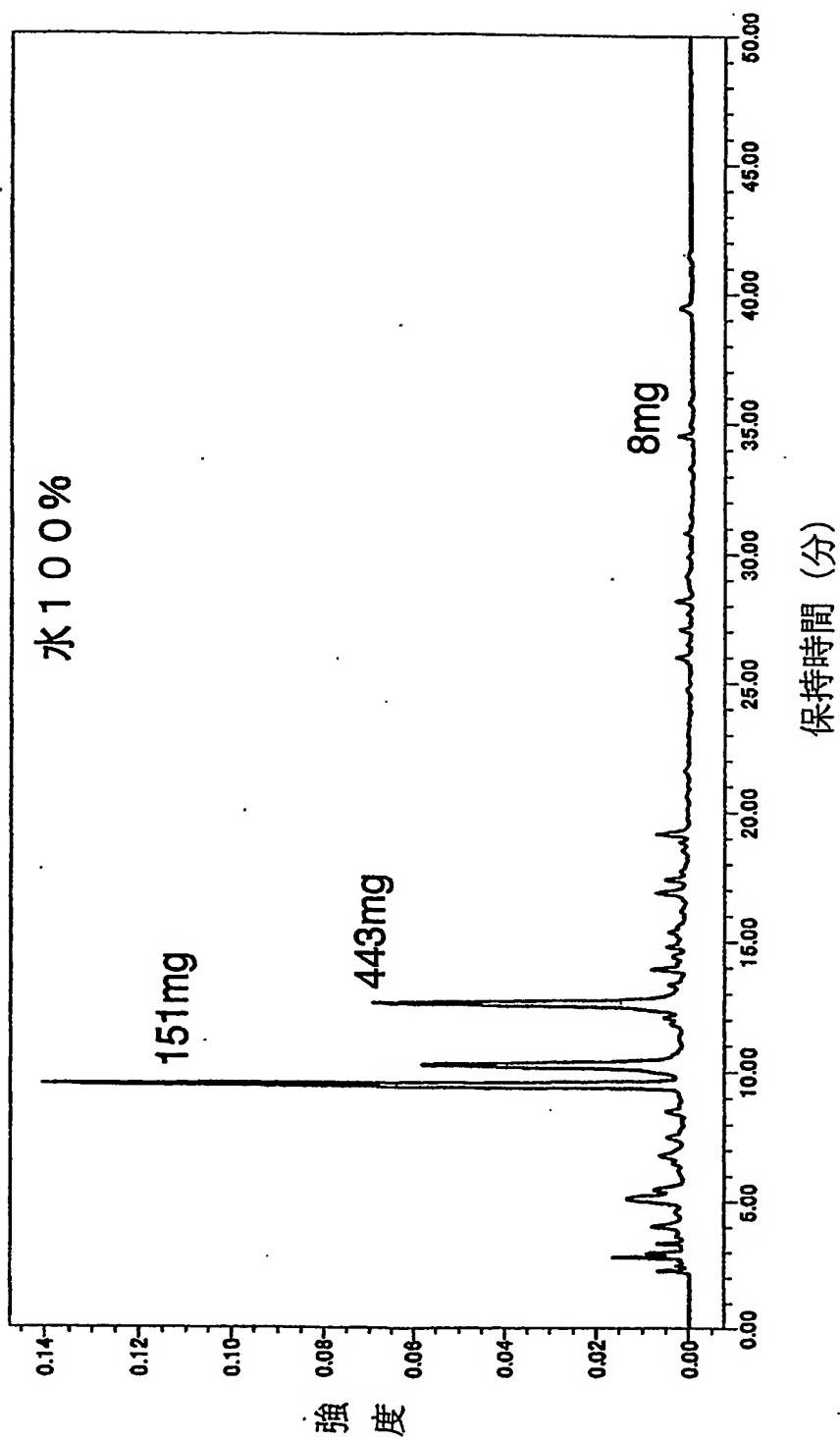


図 2

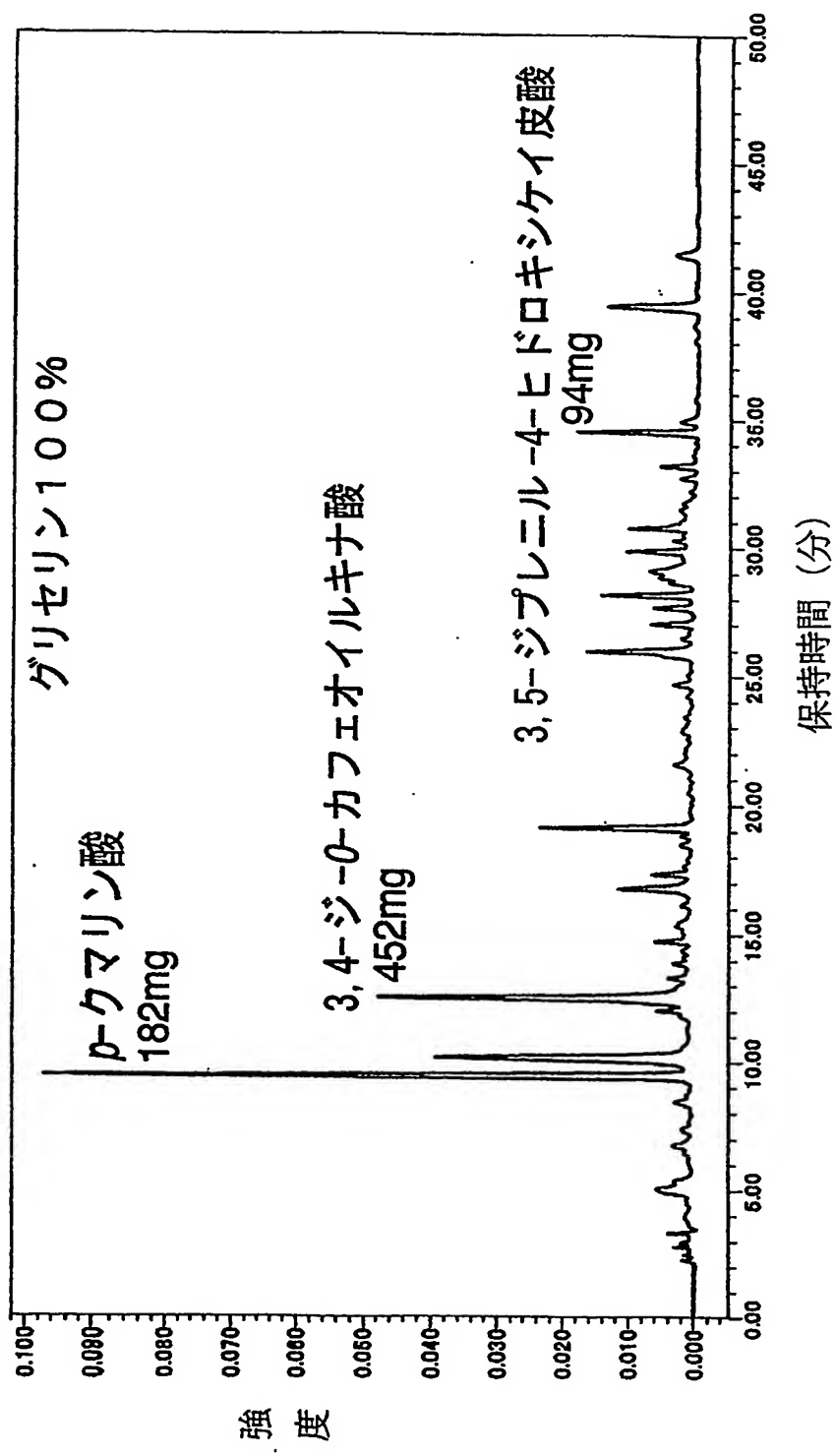


図 3

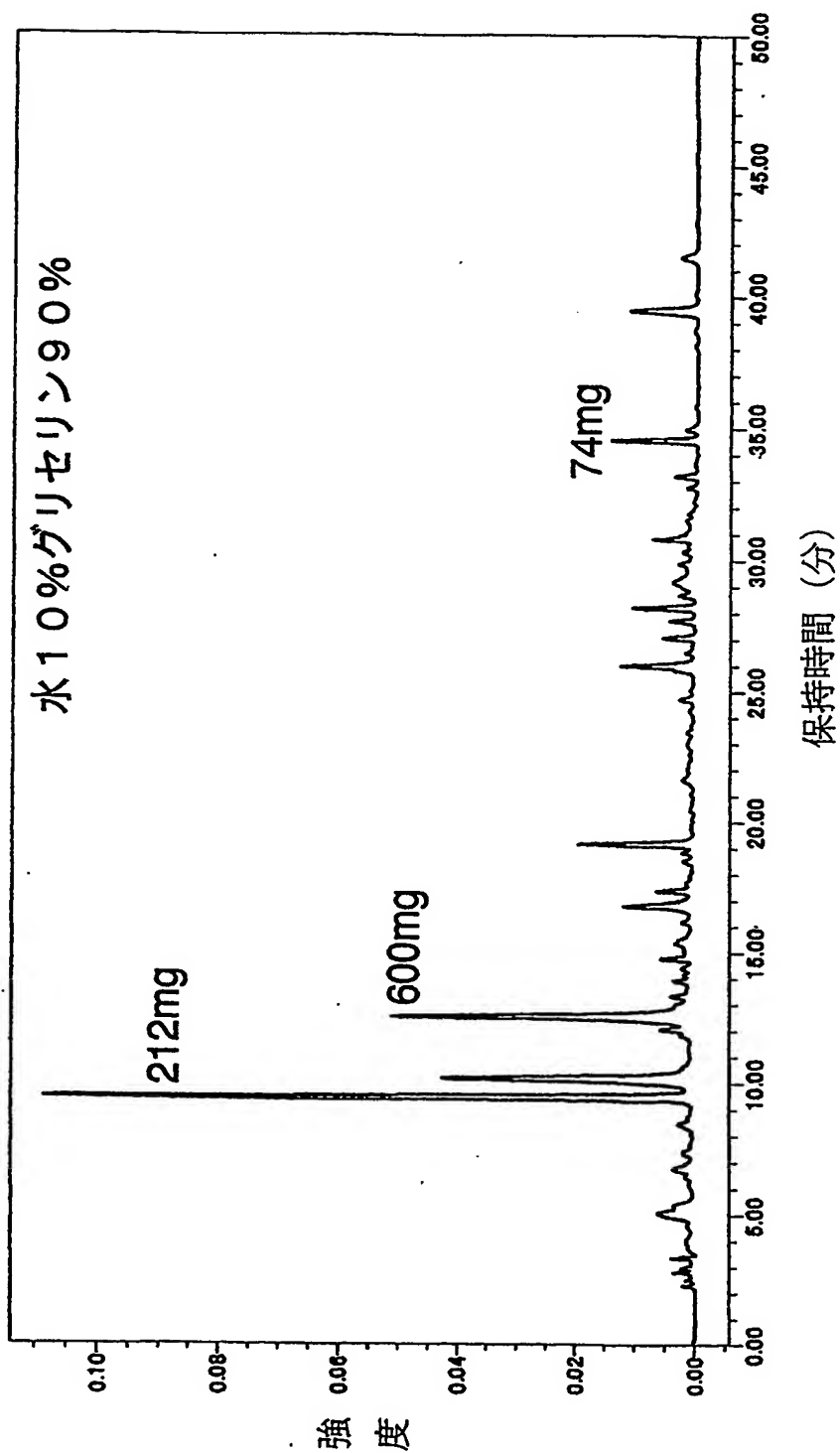
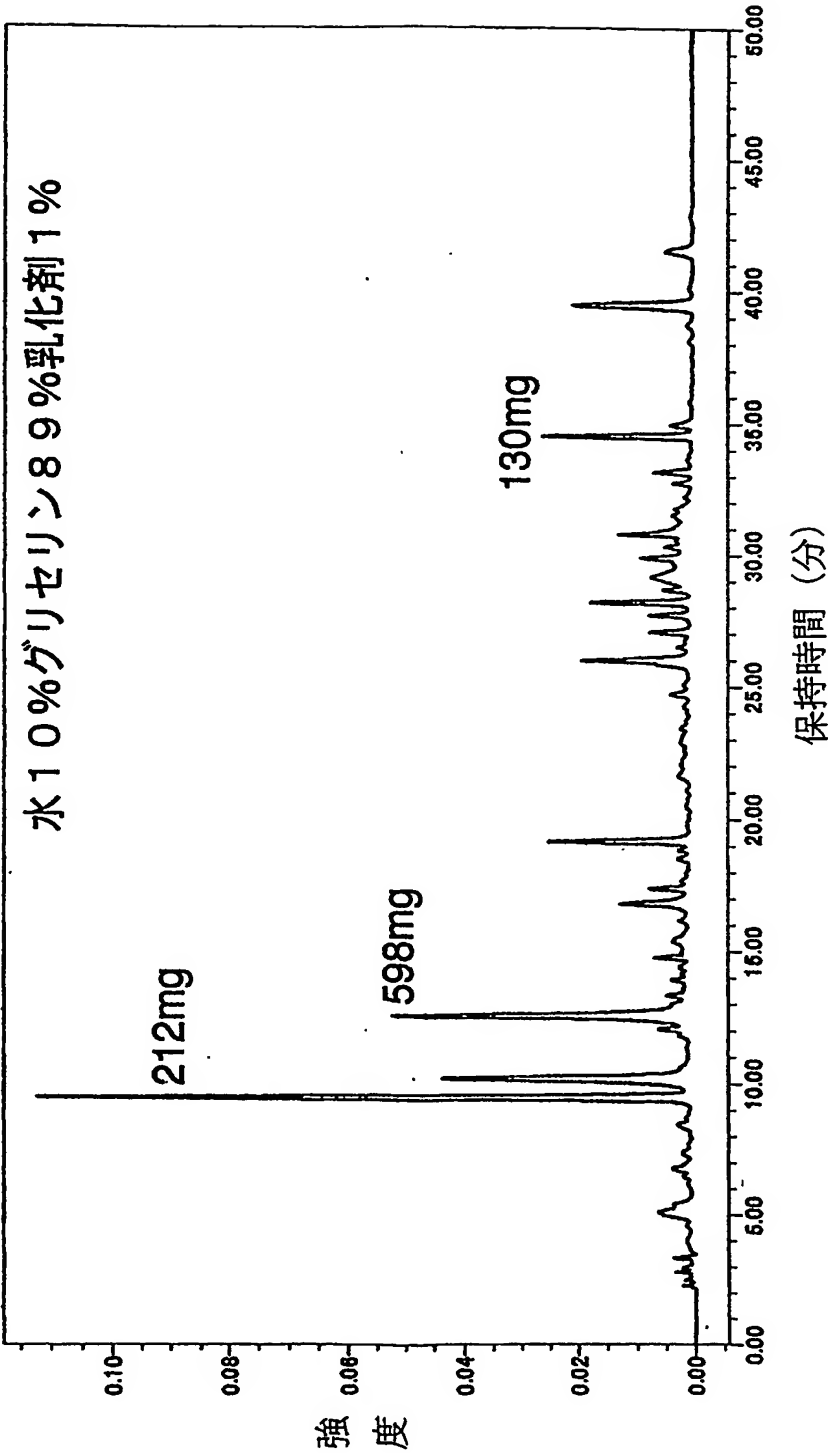


図 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019773

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/352, 31/192, 31/216, 31/11, 47/10, 47/14, 47/24,
47/36, 35/64, 7/00, A61P39/06, A23L1/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/352, 31/192, 31/216, 31/11, 47/10, 47/14, 47/24,
47/36, 35/64, 7/00, A61P39/06, A23L1/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), CAOLD (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2003-61593 A (Api Kabushiki Kaisha), 04 March, 2003 (04.03.03), (Family: none)	1, 2, 5, 6 3, 4
X Y	JP 2002-306092 A (Kabushiki Kaisha FI Corporation), 22 October, 2002 (22.10.02), (Family: none)	1, 2, 5, 6 3, 4
X Y	Tetsuya MATSUNO, "Propolis - Sono Yakko o Saguru", Kabushiki Kaisha Riyousha (1995 Nen Tokkyocho Ukeire), pages 50 to 66	1, 2, 5, 6 3, 4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
31 January, 2005 (31.01.05)

Date of mailing of the international search report
15 February, 2005 (15.02.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019773

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Matsuhige K., "Propolis Yurai no Dicaffeoyl quinic acid Yudotai no Yukona Free Radical Shokyo Kassei", Journal of traditional medicines (1996), Vol.13, No.3, pages 217 to 228	1-6
Y	HAYASHI K., "Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis:3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant", Chemical & Pharmaceutical Bulletin (1999), Vol.47, No.11, pages 1521 to 1524	1-6
Y	Kiyoshi MIDORIKAWA, "Brazil-san Propolis no Hinshitsu Hyoka ni Kansuru Kenkyu", Honeybee Science, 2003 Nen, Vol.24, No.1, pages 15 to 20	1-6
Y	KUMAZAWA S., "Antioxidant activity of propolis of various geographic origins.", Food Chem., 09 December, 2003 (09.12.03), Vol.84, No.3, pages 329 to 339	1-6
Y	Shigemi TAZAWA, " Mitsubachi Yurai Genryo Sono Genjo to Oyo to Jissai Propolis no Seibun Bunseki to Kagakuteki Hinshitsu Oyobi Tyrosinase Sogai Kassei", Fragrance Journal (2002), Vol.30, No.3, pages 25 to 32	1-6
Y	Tatsuhiko TSUTSUMI, "Mitsubachi Yurai Genryo Sono Genjo to Oyo to Jissai Mitsubachi Yurai Genryo no Koshohin eno Oyo", Fragrance Journal (2002), Vol.30, No.3, pages 17 to 24	1-6
Y	Kazuo AKUTSU, "Mitsubachi Yurai Genryo Sono Genjo to Oyo no Jissai Mizu Chushutsu Propolis no Tokucho to Sono Oyo", Fragrance Journal (2002), Vol.30, No.3, pages 50 to 54	1-6
Y	JP 07-75534 A (Yakult Honsha Co., Ltd.), 20 March, 1995 (20.03.95), (Family: none)	1-6
Y	JP 2002-84992 A (Nippon Propolis Kabushiki Kaisha), 26 March, 2002 (26.03.02), (Family: none)	1-6
Y	JP 2000-201634 A (Nippon Propolis Kabushiki Kaisha), 25 July, 2000 (25.07.00), (Family: none)	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019773

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 11-89921 A (Hiroyoshi HAMANAKA), 06 April, 1999 (06.04.99), (Family: none)	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/352, 31/192, 31/216, 31/11, 47/10, 47/14, 47/24, 47/36, 35/64, 7/00, A61P39/06, A23L1/30

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/352, 31/192, 31/216, 31/11, 47/10, 47/14, 47/24, 47/36, 35/64, 7/00, A61P39/06, A23L1/30

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAPLUS (STN), CAOLD (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 2003-61593 A (アピ株式会社) 2003.03.04 (ファミリーなし)	1, 2, 5, 6 3, 4
X Y	JP 2002-306092 A (株式会社エフアイコーポレイション) 2002.10.22 (ファミリーなし)	1, 2, 5, 6 3, 4
X Y	松野哲也, "プロポリスーその薬効を探る" 株式会社リヨン社 (1995年特許庁受入), pp. 50-66	1, 2, 5, 6 3, 4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31.01.2005

国際調査報告の発送日

15.2.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

安藤 倫世

4P

9.837

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Matsushige, K., "プロポリス由来のジカフェオイルキナ酸誘導体の有効なフリーラジカル消去活性" 和漢医薬学雑誌 (1996), VOL. 13, NO. 3, pp. 217-228	1-6
Y	HAYASHI, K., "Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant" Chemical & Pharmaceutical Bulletin (1999), VOL. 47, NO. 11, pp. 1521-1524	1-6
Y	緑川淑, "ブラジル産プロポリスの品質評価に関する研究" ミツバチ科学, 2003年, VOL. 24, NO. 1, pp. 15-20	1-6
Y	KUMAZAWA, S., "Antioxidant activity of propolis of various geographic origins." Food Chem., (2003. 12. 09) VOL. 84, NO. 3, pp. 329-339	1-6
Y	田沢茂実, "ミツバチ由来原料 その現状と応用の実際 プロポリスの成分分析と化学的品質およびチロシナーゼ阻害活性" Fragrance Journal (2002), VOL. 30, NO. 3, pp. 25-32	1-6
Y	堤龍彦, "ミツバチ由来原料 その現状と応用の実際 ミツバチ由来原料の香粧品への応用" Fragrance Journal (2002), VOL. 30, NO. 3, pp. 17-24	1-6
Y	阿久津和夫, "ミツバチ由来原料 その現状と応用の実際 水抽出プロポリスの特徴とその応用" Fragrance Journal (2002), VOL. 30, NO. 3, pp. 50-54	1-6
Y	JP 07-75534 A (株式会社ヤクルト本社) 1995. 03. 20 (ファミリーなし)	1-6
Y	JP 2002-84992 A (日本プロポリス株式会社) 2002. 03. 26 (ファミリーなし)	1-6
Y	JP 2000-201634 A (日本プロポリス株式会社) 2000. 07. 25 (ファミリーなし)	1-6
Y	JP 11-89921 A (浜中博義) 1999. 04. 06 (ファミリーなし)	1-6